

Stavrianopoulos et al., Serial No. 08/486,070 (Filed June 7, 1995)
Exhibit 9 [Fifth Supplemental IDS -- February 6, 2006]

EXHIBIT 9

Enz-7(P)(C3)

別冊

蛋白質核酸酵素

核酸実験法 下

METHOD

IN

NUCLEIC

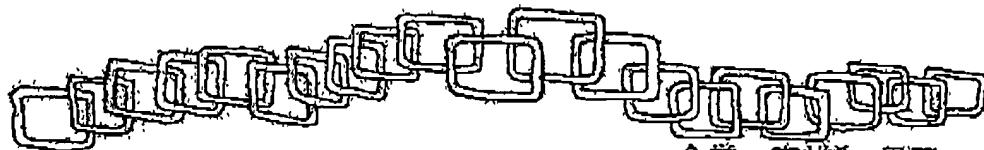
ACID

RESEARCH

1973

共立出版株式会社

メンブランフィルターを用いた DNA-DNA hybridization法



今井 康雄* 黒田 律**

はじめに

DNAの二本鎖を *in vitro* で分離、再結合させることができなくなまで以来、genetic homologyについて、DNAレベルで調べることができるようになつた。また、DNA-DNA hybrid形成の特異性を利用して、多種のDNA混合物中の特定のDNAについての解析が容易に行なえるようになった。

DNA-DNA hybridizationのいろいろな方法が開発されているが、その主なものは、McCarthyらのDNA agar法¹⁾と、Denhardtらのメンブランフィルター法²⁾である。前者はDNAを多量に必要とするので、細菌やファーダーDNAを用いる研究には向かない。一方、後者は、少量のDNAでよいこと、操作が簡単で一度に多量の試料を扱えることなどすぐれているが、DNAを多量に用いることが困難であるので、動物細胞の系のようにゲノムサイズの大きいものの解析には利用しにくい。ここでは、ファーダーと細菌の系に主眼をおいて、筆者の研究室で行なっているメンブランフィルターを用いる方法を中心にしるすことにする。

なお、核酸どうしのアニーリングに関する総説として、McCarthyとChurchによるもの³⁾と Midgley⁴⁾および、De Ley⁵⁾によるものがある。参考されたい。

1. DNAのrenaturationの基礎的性質

DNA鎖のrenaturation⁶⁾は、2つの鎖に荷電したポリヌクレオチド鎖どうしの反応であるため、カチオンの濃度が高いほど反応は速く進行する。この場合、塩濃度が高いと T_m (DNA融解温度) が上昇するので、一般に反応温度も高める必要がある。さらに、pH、温度、

DNA鎖の長さやゲノムの大きさなどにも依存する。繰り返しのないDNAでの溶液中の renaturation kineticsに関する理屈的基礎論より、種々の要因の影響について、WebmerとDavidsonの詳細な報告¹⁰⁾があるので、まずはじめに、その主な点を含めて、DNA-DNA hybrid形成反応の基礎的な性質を紹介する。メンブランフィルターを用いた場合も、一、二の点を除いて基本的に同じ反応形式をとると考へてよいので、個々の実験の場合の条件設定の参考にしていただきたい。

1. 反応様式

DNAのrenaturationの反応は二次反応の様式で進行する。すなわち、相補的なDNA鎖が衝突し最初の有効な塩基対が形成される段階が律速段階になる。統いて起こる二本鎖の完成への "linking" 反応は非常にすみやかに進行する。

溶液中の一本鎖DNAの過度を P で表わすと、renaturation反応が二次反応に従うものとすれば、次式が成り立つ。

$$\frac{d(P)}{dt} = k \frac{(P)^2}{2} \quad (1)$$

(t : 反応時間, k : renaturation 反応の速度定数)

積分して、一本鎖DNAの初速度を P_0 、時間 t における濃度を P とすれば、

$$\frac{P_0}{P} = \frac{kP_0}{2} t + 1 \quad (2)$$

となる。

実験的に、 P_0/P が反応時間に対して直線性を持つこと、速度定数 k がDNAの初濃度の速いによって変化しないことが示され¹¹⁾、DNAのrenaturationが二次反応に従うことが証明されている。

2. 温度の影響

renaturation反応の速度定数 k は、図1¹²⁾に示したような温度依存性を示し、一般に ($T_m - 25^\circ\text{C}$) の付近で最大となる。

3. DNA断片の大きさの影響

一本鎖DNA分子の平均のヌクレオチド数を L とすると、経験的に $k \propto \sqrt{L}$ が成り立つ。したがって、溶液中

* Yusuke Imai, 名古屋大学医学部分子生物学研究施設(名古屋市千種区平野町)

** Rikio Kuroda, 球光学大医学部生理学教室(名古屋市千種区栄町)

Membrane filter technique for DNA-DNA hybridization

* 図1, 図5および図7は、WebmerとDavidsonの論文¹⁰⁾中の表の要點を簡にしたしたもの。細かい条件の違いを無視してプロットしてある点に注意されたい。

メンブランフィルターを用いた DNA-DNA hybridization 法

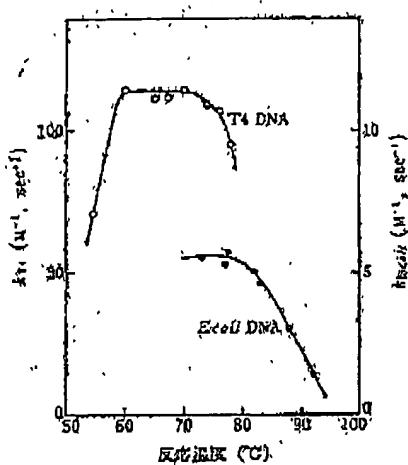


図 1. renaturation の温度依存性¹²
反応は 1.04 MNa^+ の条件で行なはれていた
 $T_{\text{denature}} = 92^\circ\text{C}$
 $T_{\text{annealing}} = 98^\circ\text{C}$

で反応させた場合は DNA 鎮が長いほど、反応速度が大きくなる。一方、後述するメンブランフィルター法では、加えた標識 DNA の溶液中での self-annealing を最小にするために逆に L を小さくする処理を行なう。

DNA の hybrid 形成能は、12 ネクレオチド以上の鎮長が必要で、また、特異性を示すためには T4 DNA の場合、17 ネクレオチド以上の鎮長が必要となる¹³。また、温度が低いと特異性が弱く(図2)。鎮長があまり短いと T_m が下りすぎて高温でのアニューリング反応

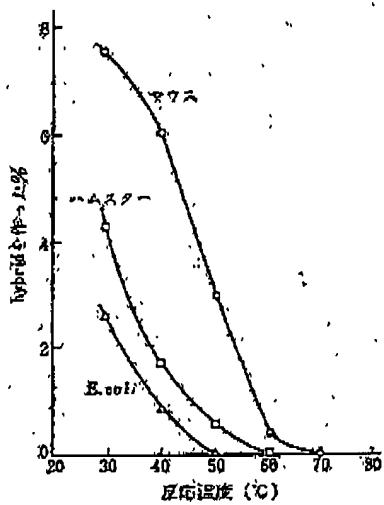


図 2. renaturation の温度と特異性¹³
 ^{14}C -マウス DNA: (35 ネクレオチドの大ささ) $0.4 \mu\text{g}$ を
100 μg のマウス、ヘムスター、E. coli の DNA と 1 時間反応させた。反応液は 0.5% KCl-0.01% Tris 液(pH 7.6)

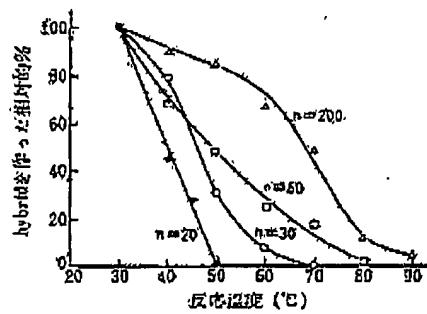


図 3. DNA 断片の大きさと反応性¹⁴
100 μg のマウス DNA に対して、大きさを変えた ^{14}C -マウス DNA ($0.1 \mu\text{g}$) を加え反応させた。△: スクレオチドの混合度

の効率が悪くなる(図3)。したがって、特異性をきちんと持たせ、反応をすみやかにさせるには、DNA 鎮は少なくとも、200 ネクレオチド以上の長さを待たせるべきであろう。

4. ゲノムの大きさと GC 含量の影響

同じ DNA 濃度でも、細菌の DNA よりファージ DNA のほうが、renaturation の速度が大きい¹⁵。ゲノムあたりの塩基対の数を N とすると、 k_{off}/N なる關係が成立立つ。図4は、種々の DNA について、反応速度定数の値をゲノムサイズに対してプロットしたもので、上の関係が成立していることがわかる。したがってゲノムサイズの大きい DNA を扱うときには、反応時間を長くするか、DNA 濃度を増すか、いずれかの対策を講じる必要がある。

また、ゲノムサイズは同程度でも、GC 含量の大きい DNA ほど、反応速度が大で、GC 含量 34, 41, 50, 64

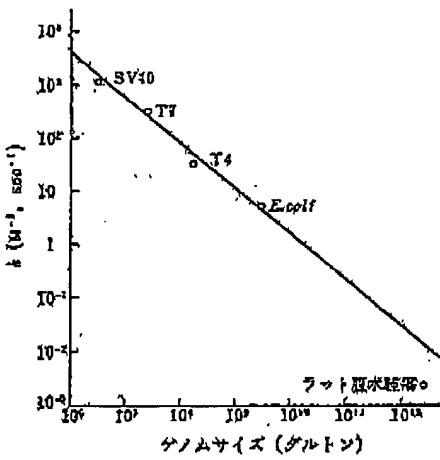


図 4. ゲノムの大きさと反応速度定数¹⁶
用いた DNA (すべて、約 7S の大きさにしてある)

% のとき、相対的な k の値は 0.69, 0.81, 0.98, 1.27 と大きくなる。したがって、renaturation 反応を時間的に経過でみると、最初は GC 含量の高い DNA 断片から反応が進んでいることがわかる。

5. pH, イオン強度および粘度の影響

renaturation は pH 7.0 附近で (図 5)、イオン強度は高いほど (図 6) 反応速度は大きくなる。また、反応液の粘度の上昇につれて k の値は小さくなる (図 7)。

II. DNA-DNA hybridization

メンブランフィルターを用いる DNA-DNA hybridization 法は、Gillespie と Spiegelman により DNA-RNA hybridization 法として開発されたもの¹¹を、DNA にも適用できるように改良したものである。一本鎖 DNA は RNA や二本鎖 DNA とちがってメンブランフィルターによく吸着する。したがって、hybridization の反応中に一本鎖 DNA がメンブランフィルターへ非特異的に吸着するのを防ぐことが必要である。Denhardt¹² は、一本鎖 DNA を固定したメンブランフィルターをあらかじめアルブミンおよび合成ポリマーで被覆してから hybridization 反応を行ない、溶液中の一本鎖 DNA の非特異的吸着を防いた。Legault-Démare¹³ は、シメチルスルホキシド中で hybridization を行ない、非特異的吸着を防いだ。また、Wernar¹⁴ と Cohen¹⁵ は、hybridization の後、フィルターを低イオン強度で、かつ高い pH の緩衝液で洗浄して非特異的に吸着した DNA を洗い去りバックグラウンドを下げている。この三つの方法についてすでに詳しい紹介があるのでそれを参照されたい。ここでは、筆者らの行なっている Denhardt 法をさらに改良した方法について述べる。

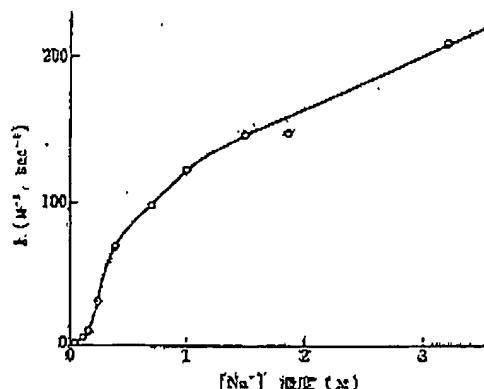


図 6. renaturation 反応に対するイオン強度の影響¹⁶
図 5 と同じ条件 (pH は 7.0) で反応させた

1. DNA の調製

A. メンブランフィルターに固定する DNA
細菌の DNA は Marinur 法¹⁷, Thomas 法¹⁸あるいは両者を組み合わせた方法で抽出する。RNA, 蛋白質でできるだけ除去する。フェーバーの DNA はフェノール抽出¹⁹によって調整する。

B. 反応液に入れる DNA

放射活性のある DNA を用い、放射能で測定するので DNA として計算である必要はない。RNA が拮抗阻害を起こすほどはいっては困る。蛋白、脂質などは反応に影響しない。したがって、細菌からアルカリと表面活性剤で抽出した DNA をショ糖濃度勾配法で分画した後、透析でショ糖を除いただけですぐ使用することも可能である。試料 DNA は、使用直前に熱処理などにより一本鎖にしておく。

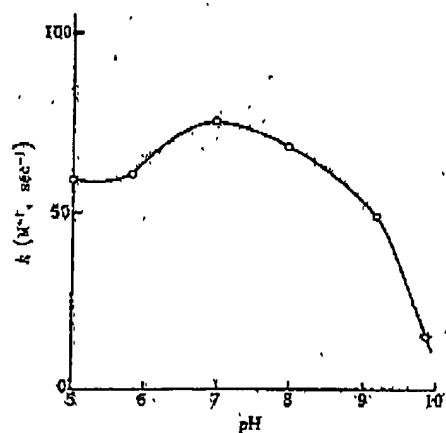


図 5. renaturation 反応の pH 依存性¹⁶
T4 DNA (20S) を 0.4M Na⁺ 存在下で反応させた。温度は 30°C (Tm = 35°C)

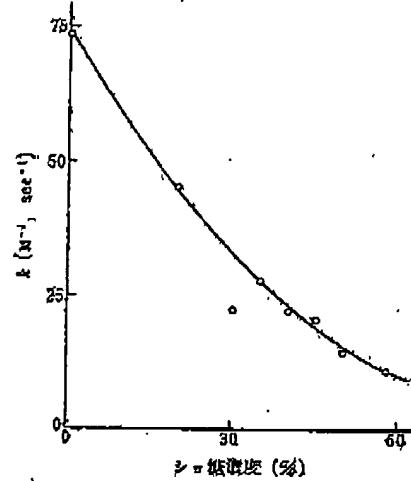


図 7. renaturation 反応に対する粘度の影響¹⁶
図 6 と同じ条件

メンブランフィルターを用いた DNA-DNA hybridization 法

2. DNA のメンブランフィルターへの固定

準備するもの：10×SSC (10 倍濃度の SSC, SSC は 0.15M NaCl+0.015M クニン酸ナトリウム)。メンブランフィルター：直径 20~25mm, Millipore HA 0.45μ, Schleicher-Schuell Type B-6 coarse または Sartorius membranefilter MF50, 液体シッターレーションカウンター用ガラスバイアル (以後、バイアルといふ)。

方法：二本鎖 DNA は 0.1×SSC 中で 100°C, 5 分間熱処理し、撹拌浴して一本鎖にする。このとき DNA 濃度を可能な限り薄くして、renaturation を少なぐする。一定量をとり、6×SSC 濃度にし、体積を 3~5 ml にする。あらかじめ 6×SSC 中に浸しておいたメンブランフィルターを用いてゆっくり済過する。流速は 3 ml/30 秒ぐらいでよいが、DNA の分子量が 6×10^6 ダルトンよりも小さいときは済過を非常にゆっくり (3ml/10 分以上) にしないとフィルターへの吸着効率が低下する。フィルターを 5 ml の 6×SSC で上と同じ速度で洗浄後、バイアルに移し一夜テシケーター中でシリカゲル上減圧下で乾燥させる。フィルターはバイアルのまま真空乾燥器で減圧下で 80°C, 2 時間熱処理し、DNA をフィルターに固定する。真空乾燥器がないときは、普通の乾燥器で 80°C, 2~3 時間熱処理し、すぐにテシケーターに移し、シリカゲル上で冷却させてもよい。DNA を固定したフィルターは乾燥状態で保存するかぎり、長期間わたって使用可能である。

3. プレイムキュベーション

準備するもの：PM; 0.02% フィコール (Pharmacia, 平均分子量 400,000), 0.02% ポリビニルピロリドン (PVP) (Sigma, 平均分子量 360,000), 0.02% ウシ血清アルブミン (BSA) (Sigma, Fraction V), 0.05% SDS シルホ酸ナトリウム (SDS) を 3×SSC 中に溶かしたもの。

方法：DNA-フィルターを入れたバイアルに 1ml の PM を加え、完全にふたをして 65°C の水浴に沈め 6 時間保温する。著者らは、金網のカゴを作り薫しをつけて沈めている。保温後はただちに DNA-DNA hybridization を行なわせるのが望ましいが、やむをえない場合は冷房室 (4°C) で一夜放置しても効率はそれほど下らない。

4. DNA-DNA hybridization

準備するもの：バイアル、10×PM; 3×SSC 中に PM の 10 倍濃度のフィコール、PVP、BSA、SDS を含むもの。3×10⁻⁴M Tris-塩酸緩衝液 (pH 9.4)。

方法：プレイメキュベート中止、あらかじめ別のバイアルに 70 μl の 10×PM と 630 μl の調製した試料の一本鎖 DNA (3×SSC 中) を入れておく。プレイメキュベートしたフィルターをとり出し、バイアルの口でよく PM をぬぐいとった後、試料のはいったバイアルに移し、

前と同様の方法で 65°C, 12 時間保温する。保温後、フィルターを 3×10^{-4} M Tris-塩酸緩衝液 (pH 9.4) で 3 回すすぎ、さらに吸引しながらフィルターの両面を 50ml ずつの同じ浴液で洗浄する。赤外線ランプで乾燥後、トルエン系のシンチレーターを用いてカウントする。加えた標識 DNA の数カウント量は、低濃度の状態で直接フィルターに定量をのせ乾燥後同様に測定し求める。

5. 輸足

A. メンブランフィルターを用いた DNA-DNA hybridization 法も基本的には I. で述べた溶液中の renaturation kinetics に従うので、ここでは改めて細かい条件などについてはあれないと。ただ、図 8 に見られるように反応液の体積に大きな依存性を示すので、反応液はできるだけ少なく、フィルターが完全に浸るだけの量まで下げるほうが効率がよい。

B. hybrid 形成能は、ゲノムサイズと self-annealing の程度によって決まる。ゲノムサイズが大きい場合には、反応時間とフィルターに固定させる DNA 量を増加させるとよい。図 9 は DNA 量を変化させたときの効率の変化とゲノムサイズの関係を示している。固定させる DNA 量が多いほどよいといつても、100 μg DNA フィルター以上になると最後の Tris-塩酸緩衝液での洗浄の速度が極端に低下し、時間がかかりすぎるのを実用的ではない。効率を上げるためにどうしても DNA 量を増やしたいときには、1 つのバイアルに何枚もの DNA-フィルターを加えるのも一法である。ただし、この場合は、全部のフィルターが完全に浸るように反応液量を増やす必

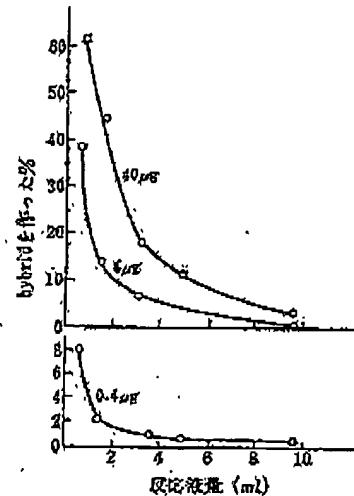


図 8. メンブランフィルター法における反応液量の影響。T4 DNA を図に示されている量フィルターに固定してある。³²P-T4 DNA (省略処理したもの) を SSC 中、60°C, 26 時間反応させた。

別冊 蛋白質・核酸 説明

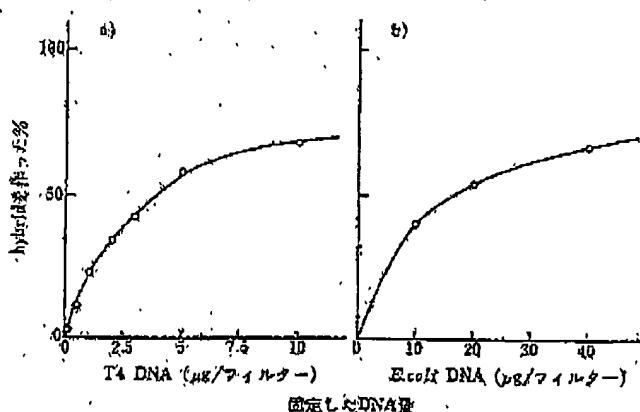


図 9. フィルターに固定した DNA 量と反応効率の関係

反応条件は本文参照。a) ^{32}P -T4 DNA: 0.1 μg , 952 cpm (大きさは 7×10^8); b) ^{32}P -E. coli DNA: 0.05 μg , 1,600 cpm (0.5N NaOH で 100°C, 7 分加熱したもの)

要がある。表 1 に筆者らの研究室でとり扱った DNA の通常用いる固定量と hybridization の効率を示す。

C. 加えた標識 DNA の溶液中での self-annealing を防ぐためには、標識 DNA の量を固定した DNA 量に比してかなり少なくするが、標識 DNA を何らかの手段で低分子化することはいい。低分子化にはアルカリ処理が簡便である。分子量 $10^8 \sim 10^9$ ダルトンの DNA なら、0.5N NaOH 中で 100°C, 7 分間加熱すると $10^8 \sim 10^9$ ダルトンくらいの大きさになり、hybridization の効率も最もよくなる。表 2 はアルカリ処理の時間と DNA の大きさの変化を示している¹⁰。アルカリ処理後、中和してから反応液に加える。

DNA の低分子化には、超音波処理も有効である。表 3 は音波処理の効率の変化を示している。

D. 反応液中に SDS を加えると、hybridization の効率には影響を与えないが、メンブレンフィルターがしのやかになり扱いやすくなる。また、ペイアルのガラス盤の凹凸がよくなり反応中にガラス壁に水滴が凝集

表 1. ゲノムサイズと hybridization の効率

固定した DNA	ゲノムサイズ (ダルトン)	μg/フィルター	% hybridization
PM2	5.3×10^8	2	75
P2	2.2×10^7	2	60~90
T7	2.5×10^7	2	80
φX174	3.0×10^8	2	63
λ	3.2×10^8	2	70
T4	1.0×10^9	2	35
E. coli	2.5×10^9	20	54
B. subtilis	4×10^9	20	55

a) ラベル DNA を $10^8 \sim 10^9$ ダルトンに断片化し、0.1 μg 以下の量で測定した

するために生ずる反応液の体積変化をなくすことができ、再現性が非常によくなる。比較的少ないカウントを用いても、duplicate したときのふれは土 1% 以下となり、多くの点をとるような実験の場合には duplication は特に必要としない。この方法でのバックグラウンド (DNA を固定していないフィルターへの非特異的な吸着) は 0.1% 以下とみてよい。SDS を加えておくと、Warkar と Coben の方法ではバックグラウンドが 0.5% から 0.05% に低下する¹¹が、上述の方法では SDS の有無にかかわらず 0.1% 以下である。SDS を加えたときの欠点は、DNA のフィルターからの逃げが若干多くなる点であるが、多くの実験の場合無視できる程度である (SDS を 0.1% に加えると 60°C, 20 時間で固定した DNA の約 5% が遊離するといふ)¹²。

E. ゲノムサイズが非常に小さい DNA を扱うときは、固定した DNA と、標識 DNA の量比を大きくしないと self-annealing が早くて hybridization の効率が低下する。

F. 実験的には、 3×10^{-3} M Tris-塩酸緩衝液 (pH 9.4) を作らなくても、Trizma base をそのまま蒸留水に溶かすと pH がほぼ 9.4 になるのでそのまま使用してもよい。

表 2. アルカリ処理の時間と DNA の平均の大きさ

処理時間	DNA の平均の大きさ (スクレオチド) ^{a)}
0 分	14,000
3 分	2,500
7 分	410
15 分	150

a) 0.5N NaOH, 100°C 处理

b) アルカリ性ショット波洗浄器で 1 分間で分離し、電荷活性マグレオチドのピーカーの位置をスクレオチド数で測したもの

表 3. 音波処理による hybridization 効率の変化

処理条件 ^{a)}	% hybridization ^{b)}
未処理	0
アルカリ性	15
音波処理・アルカリ性	38
音波処理・酸性	41

a) 音波処理は MES Ultrasonic Disintegrator, 運転出力で 20 秒行った

b) 標識した ADNA (0.05 μg , 850 cpm) を 1.5 μg フィルターと ADNA と hybridize させた

アンブランマイクターを用いた DNA-DNA hybridization 法

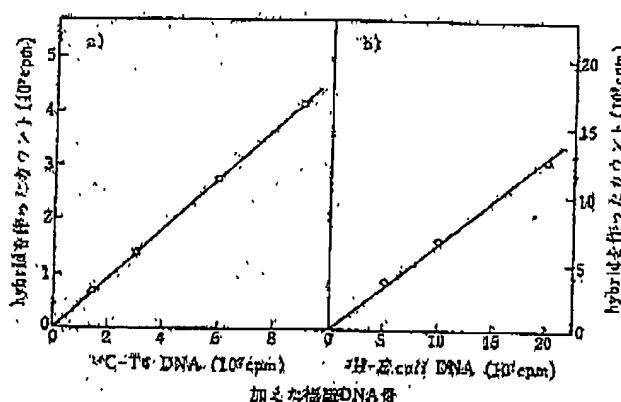


図 10. hybridization 反応の定量性

抗原抗体法(本文を参照) T4 DNA 2 μ g を固定してある。³²P-T4 DNA: 750 cpm/0.16 μ g, b) *E. coli* DNA を 20 μ g 固定してある。³H-*E. coli* DNA: 1,000 cpm/0.025 μ g. DNA はいずれもブルカリ処理で断片化した

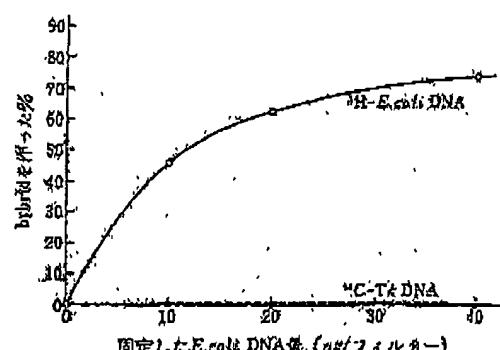
III. DNA-DNA hybridization の定量性と特異性: T4 および *E. coli* DNA を用いた実験例

1. 定量性

固定する DNA 量を一定にして、加えた標識 DNA の量を変化させると、かなりの範囲において直線関係が成り立つ(図 10)。すなはち、充分量の DNA を固定すれば、加えた標識 DNA が一定の効率で hybrid を形成する。T4 DNA の場合、2 μ g の DNA を固定すると、標識 DNA を 1 μ g 程度加えてもまだ直線関係が保たれていらざりである。

2. 特異性

図 11 は標識した *E. coli* DNA が固定した T4 DNA とほとんど hybrid を形成しないことを示している。すなはち、DNA-DNA hybridization の特異性は非常に

図 11. *E. coli* DNA と T4 DNA の相容性

E. coli DNA を固定したフィルターに ³H-*E. coli* DNA (2,000 cpm, 0.05 μ g) と ³²P-T4 DNA (2,000 cpm, 0.36 μ g) を同じマイクロに加え反応させた

高い。

図 12 は、競合の実験結果である。T4 DNA をフィルターに固定して、標識した T4 DNA を hybridize させると、ラベルしない T4 DNA で競合させると、標識 DNA の hybridization の効率は著しく低下する。*E. coli* DNA で競合させても効率は変化しない。当然のことであるが、競合させる DNA 量は、標識 DNA の量に対してではなく、固定した DNA 量に基づいて算出する必要がある。

IV. その他の応用例

1. T4 DNA の分離した相補鎖の識別

III-2 で示した特異性は、単に種類の異なる DNA 間で認められるだけではない。T4DNA の 2 本の相補鎖は ³²P-HG との結合能の差を利用して CsCl 密度勾配離心で分けられるが、この分離した DNA 鎮は、同じ DNA 鎮間の間では hybrid を形成せず、特異的に相手方 DNA 鎮とのみ hybrid を形成する(図 13)²⁰。

2. λd_{g-λ} DNA 中の細菌 DNA の定量

λd_{g-λ} DNA はその約 50% が λDNA で、残りの約 50% はガラクトースオペロン近傍の *E. coli* DNA を組み込んでいることが遺伝的方法などで推定されている。標識した λd_{g-λ} DNA を、λDNA のみを固定したフィルターと、λDNA と λd_{g-λ} DNA を混合して固定したフィルターに hybridize させると、*E. coli* DNA と λDNA の間に相容性がなければ両フィルターの差が組み込まれた *E. coli* DNA の大きさに対応するはずである。図 14 はその結果を示しているが²¹、差は約 30% で遺伝的方法などで出した値にはば一致する。やや少なく出ている

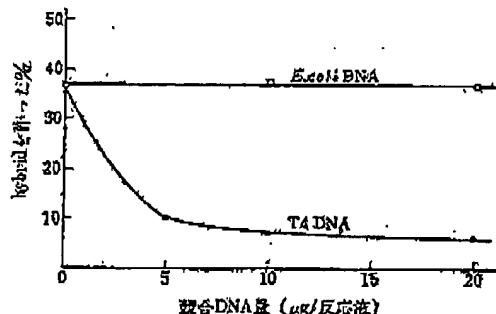


図 12. 競合 DNA の効果

T4 DNA 3 μ g を固定しておき、³H-T4 DNA 0.1 μ g と、未標識の T4 DNA または *E. coli* DNA を図の量加えて反応させた

別冊 蛋白質核酸酵素

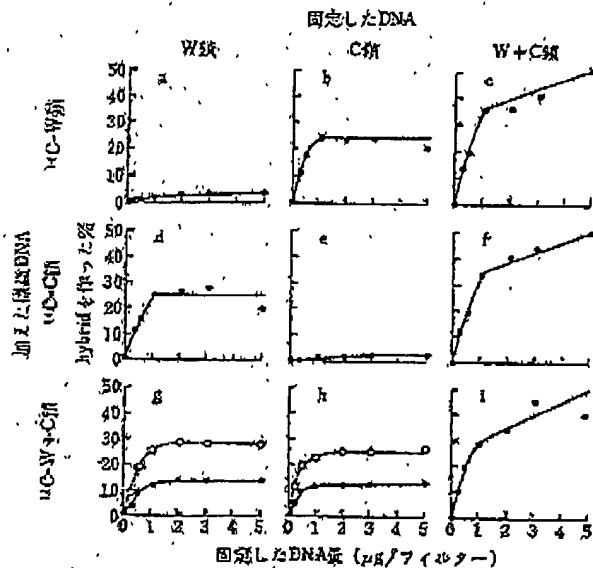


図 13. 銀と分けた T4 DNA の hybridization²³
ボリ UG を用いて、T4 DNA 銀を C 銀と W 銀に分け、それぞれ
をフィルターに固定してある。³⁵C-T4 DNA も同様に C、W 銀に分
け、各 0.16 μg (350 cpm) を加え、hybridization を行なわせた。W
+C 銀は、両者を同時に加えたもの

る理由は、実験系の問題とともに、λ-DNA と *E. coli*
DNA の間の部分的な相同意性が存在するためである²³。

3. DNA-DNA hybridization を用いての、特異的 な DNA 銀の分離

あらかじめ粗細銀に分離した DNA を固定し、それと
hybrid を作る標的 DNA 銀を分離することにより、漏
泄 DNA 銀を粗細銀に分けることができる²⁴。T4 ファ
ージ感染菌を H₂O₂ミジンで短時間ラベルし、DNA を

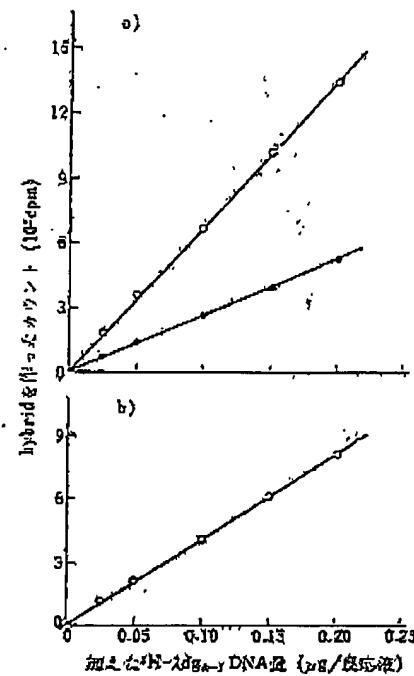


図 14. λdga-1 DNA 中に組み込まれた *E. coli*
DNA の hybrid²⁴
a) —●—: λDNA 10 μg 固定。—○—: λDNA
5 μg と λdga-1 DNA 5 μg を固定。反応には
³⁵C-λdga-1 DNA (0.774 cpm/0.1 μg) と、20 μg
の混合 λDNA を加えである
b) λ+λdga DNA フィルターに hybrid を作った
カウンタから、λDNA フィルターに hybrid を
作ったカウントを差し引いたもの

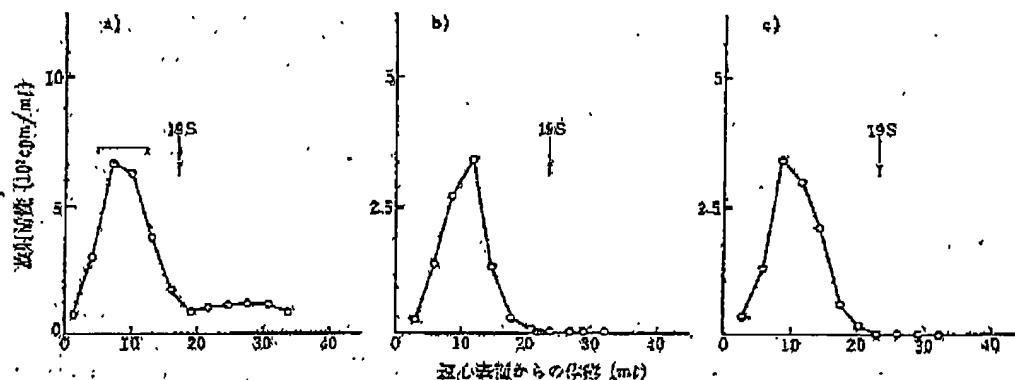


図 15. hybrid を作った複数 DNA のフィルターからの回収²⁵
a) T4 感染菌を H₂O₂ミジンでラベルし、DNA をアルカリ性シテウ酸塩匀速透心で分析したもの。カーブ
で示した部分を取り (~10S)、T4 DNA の W 銀および C 銀と hybridize させた後、フィルターを溶かして測定する
b) C 銀に hybridize したものと 0.1M NaOH-0.01M EDTA で溶出し、a) と同じ方法で分析したもの
c) C 銀に hybridize したものと b) を同様にして分析したもの

メノブランチオキシダーゼを用いたDNA-DNA hybridization 法

アルカリ性シーナ液濃度均配適ひにかかると、図15-aのようなペーパーが得られる。ピータ箇分を採り、透析後、8 mlの反応液とし、DNA-DNA hybridization を行なわせる。30枚のフィルターに T4 DNA の W 級のみを 2.4g ずつ固定し、他の 30枚に C 級を 2.4g ずつ固定させる。反応液に全フィルターを加え (W と C を区別するためフィルター一端を切っておくといい)、hybridization 反応に従って洗浄し、標識 DNA を 5 ml の 0.1N NaOH-D.01M EDTA に 10 分間浸して溶出する。各 W-フィルター、C-フィルターから溶出した DNA をもう一度、アルカリ性シーナ液濃度均配適ひで調べたものが、図 15-b, c である。どちらの大きさの DNA を扱うかぎり、このような操作の間ではそれ以上の断片化は起こっていない (回収率は W, C 級についていずれも全カウントの約 20% である)。

このような方法は、複製中の DNA のように "strand separation" の原理がうまく応用できないような既存のあつかうときとか、混合物中の特定の DNA の性質を調べたいときなどに非常に有用である。

おわりに

このDNA-DNA hybridization 反応が2次反応式に従うことを利用して、その反応速度から DNA の相容性、特に、1つのゲノム中の繰り返しの数を測定する。いわゆる Cot 分析が最近特に発生学の分野などで広く使われるようになってきた。DNA の初濃度を C_0 とすると、反応は (2) 式がら

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + kC_0 t}$$

と表せる。

したがって、反応液中に単鎖で残っている割合 (C/C_0) は、初濃度と反応時間の積 ($C_0 \times t$) が 1/3 になったときちょうど半分となる。すでに述べたようにゲノムサイズで k が変動するが、 k の代わりに $C_0 t$ を単位として表して、 k に同様の変化が追える。このようだ、 C/C_0 と $C_0 t$ を測定することによって、ゲノムサイズやゲノム中の繰り返しの量を知る方法を Cot 分析と呼ぶ。くわしい方法などはすでに紹介があり、また本書の添付の稿 (74 ページ) を参照されたい。

文 獻

- 1) E. T. Bolton, B. J. McCarthy : Proc. Natl. Acad. Sci., 48, 1390 (1962)
- 2) B. J. McCarthy, E. T. Bolton : Proc. Natl. Acad. Sci., 50, 156 (1963)
- 3) D. B. Cope, B. J. McCarthy : Proc. Natl. Acad. Sci., 50, 537 (1963)
- 4) S. Falkow, R. V. Cicerelli : J. Mol. Biol., 12, 138 (1965)
- 5) D. T. Denhardt : Biochem. Biophys. Res. Comm., 23, 631 (1966)
- 6) J. Legault-Demire, B. Desseaux, T. Heyraud, S. Siron, G. P. Ross : Biochem. Biophys. Res. Comm., 28, 580 (1967)
- 7) S. O. Werner, J. A. Cohen : Biochem. Biophys. Res. Comm., 24, 554 (1958)
- 8) B. J. McCarthy, R. B. Church : Ann. Rev. Biochem., 29, 131 (1970)
- 9a) J. E. M. Midgley : *Methods in Microbiology* (ed. J. R. Norris, D. W. Ribbons), 5A, 331, Academic Press (1971)
- 9b) J. Deley : *ibid*, 5A, 311 (1971)
- 10) J. G. Wether, N. Davidson : J. Mol. Biol., 81, 349 (1968)
- 11) B. L. McConaughay, B. J. McCarthy : *Methods Bio-phys. Acta*, 349, 160 (1967)
- 12) J. Marmur, F. Doty : J. Mol. Biol., 3, 583 (1951)
- 13) D. Gilstrap, S. Spiegelman : J. Mol. Biol., 12, 829 (1955)
- 14) 小田均一郎 : 本誌, 13, 1055 (1958)
- 15) J. Marmur : J. Mol. Biol., 8, 203 (1961)
- 16) G. A. Thomas, Jr., K. L. Berns, T. J. Kelly, Jr. : *Procedures in Nucleic Acid Research* (ed. G. L. Cantoni, D. R. Davies), p. 535, Harper & Row Publishers, New York (1966)
- 17) C. A. Thomas, Jr., J. Abelson : *Procedures in Nucleic Acid Research*, 附上 p. 583
- 18) 金森義雄 (未発表)
- 19) 富山翠二 (未発表)
- 20) 同本吉二 (未発表)
- 21) K. Sugimoto, T. Okazaki, Y. Imae, R. Okazaki : Proc. Natl. Acad. Sci., 63, 1343 (1969)
- 22) Y. Imae, T. Fukasawa : J. Mol. Biol., 44, 585 (1970)
- 23) H. Yamagishi, A. Skalka : J. Mol. Biol., 53, 417 (1971)
- 24) T. Okazaki, R. Okazaki : Proc. Natl. Acad. Sci., 66, 1242 (1969)
- 25) 村松正亮 : 本誌, 17, 509 (1972)

別冊 现代詩歌集成

ために一概なバッキに対するのは非常にむずかしい。とにかくあつらゆハゲップ等真に比べて変化に乏しいので、等真の仕上げには苦労する。トリミングに上ってゴミはさけ、少しの照射ムラなら強い焼きによって除く。そのほかにもスケールを入れるために、コントラストを増すために一度フィルムを印西紙に焼きつけてからそれを接着するといい。

具体的な手順を聞くと、次のようになる。なるべくゴミのないきれいな部屋の核磁分子を見つめたら、照射ムラができないように充分照射ビームを広げてショッターを切る。フィルムの現像は新しい現像液を使ったほうがコントラストがよい。現像中はよくかき混ぜて現像ムラのできないようにする。印画紙は E-6 の一精高コントラストの紙を使い、照射ムラがあるようなら、明るいほうを引伸し盤の下に手を気で少しだけ置ってそのムラをとるようにする。一枚のフィルムに対して 10 枚やらい焼きつけてみて一番よいものを選ぶ。ゴミがあったらそ

れをさけてトリミングする。倍率を計算してスケールを入れ、スライドを作ると同時に使うミニコピーフィルムで接写する。それをもう一挙F5の引伸し用紙に焼きついで、そのときまだムラが残っているようなら、また焼き直さでそれをとる。

文 藝

- 1) A. Kleinschmidt, D. Lang, D. Jackman, R. Zahn : *Biochim. Biophys. Acta*, 61, 857 (1952)
 - 2) C. A. Thomas, Jr. : *J. Gen. Physiol.*, 49, 143 (1966)
 - 3) D. Lang, H. Bujard, B. Weiß, D. Russell : *J. Mol. Biol.*, 23, 163 (1957)
 - 4) 稲家英志 : *微生物学雑誌* (日本生物物理学公報), II, 338, 古川書店, 京都 (1968)
 - 5) D. Lang, A. K. Kleinschmidt, R. K. Zahn : *Biochim. Biophys. Acta*, 88, 142 (1964)
 - 6) D. Lang, Michiko Mitsui : *Macromolecules*, 9, 373 (1970)
 - 7) C. N. Gordon, A. K. Kleinschmidt : *Biochim. Biophys. Acta*, 155, 305 (1968)
 - 8) 稲家英志 : *本原*, 12, 521 (1957)

卷之三

☆ 本誌「蛋白質の研究」も算入るもので、誕生は大正16年で18才。その間にあって、生化学および関連研究の変遷は他の分野と比較しても、まさにに流暢かつ多岐。研究人脈も変わる。いきおい本誌も大きくなり小なり而もその筋と世話を兼ねていく。毎年1回臨時にさみ込む読者カードを発行していくのも、また直接わざわざ日本研究室を廻ったり、学会の取材等などからもその勢ぞうと連絡への頻度をうかがい知るのである。

「最近の筋筋をみてみると、たとえば絶対から絶対何々のテーマそのものが狭すぎるね。たとえば「分化の生化学」とか「ヒストンの物理化学」とか、そうした既定が望ましい。常にアーティストックする方向だが」。また、「個々の研究はその思想過程をみたいなところがほしいわ」。さらにはある筋筋の縮緼标记でねお名さで、もっと生剤に直接した近いをしたいとあの筋筋は今や学生さんには認められない、などと考評? もされぬ、その位たぐさんへ、一つ一つそうした希望とか批判を審査として筋筋に消化吸収をした上で、また筋筋とな一方向が見いだせたらそれととも、

女 昨年 10 月江上巻 (RNA 痘) が刊行され、各方面から DNA 痘も早くと懇意ないが如き次第、よりやくどうにか終了

後記——
の日となった。遺産を生命とする構成としての歴史が生まれた
——(1975年1月15日) 田代義典

かどうかについてではあまり自信がもてない。
技了ゲラを並べておぎを感じることは、なんとかなんの実験
手段があるのでどうということだ。しかしこれでも重要な部分
で抜けている項目がいくつもあることは確かである。上にい
え、この類の書物の刊行日というものは、大勢の執筆者の連合、
出版社、印刷社の人の都合、薬局での都合など、さまざまな
要素の統合された期日であるのだから、時間的に間に合わない
といいういたしかたない面もあるであろう。足りない点はいずれ
本集で補って行かなければならぬ。

我哉にあたっては、なるべく具体的に、細かな注意、コツ、のようないものまで含めていただくようお願いした。勿論、この書き行なえば必ずうまくいくといった性質のものではないだろうが、かなり決定的な参考書としてお役にあつことを期待している。

本音楽委員の石浜明、岡崎浩造、丸吸洋正、西村肇各先生には、各役員で多大のご協力をしてくれました。とりわけロッシーの中を楽曲的に、全部のゲッセを読んでいただぐなどと骨折り下さった石浜先生に深くお礼申上行ます。(N)

劉典 等白質 核酸 腸密

昭和48年7月10日 郵便

發行所 共立出版社・社
東京都文京区小日向4丁目6番19号

核酸素體法 下

緝集人 猶·山·光·保

郵局代號 東京 57035

— 楽 斯 城 —
社 會 1300 月 (資料 110 円)

発行人 萩 鮎 正男
印刷人 大久保 錠児
印刷所 新日本印刷株式会社
東京都新宿区市ヶ谷本村町27

©1973
by Kyoritsu Shuppan Co., Ltd.
Publisher, 4-5-19, Kotinata,
Bunkyo-ku, Tokyo